

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830123

研究課題名(和文) IL13Ra2 標的化イムノトキシンによるメラノーマがんマウスの抗体治療

研究課題名(英文) IL13Ra2, therapeutic target of melanoma, identified by unique antibody screening technology.

## 研究代表者

福原 武志 (fukuhara, takeshi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：20359673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治がんの治療へ向けて分子標的の同定が様々な方法ですめられているが、我々は抗体探索を起点としたシード抗体の取得と開発を目指している。薬物送達機能を有する抗体の単離および抗原の同定を進めて来た結果、メラノーマを標的化する抗体のうち、特に内在化活性を有する抗IL13Ra2抗体を樹立した。メラノーマの組織アレイおよび病理学的な解析から、IL13R 2陽性群が確かに存在した。IL13-IL13R 2経路が腫瘍形成に血管新生へ寄与する結果を得ており、作用機序と治療用抗体としてイムノトキシンを創製して検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Current approach of cancer therapy, such as chemotherapy, radiotherapy and surgery, has been treated for many years, but it is still hard to cure completely. Especially in chemotherapy, one of long-lasting problem is the side effect of administrated drug, following the interference of regimen.

To overcome this issue, we developed unique targeting technology coupled with monoclonal antibody (MoAb) screening system that enable us to utilize both selectivity and specificity. To establish selective and specific antibody that target cancer biomarker, classical hybridoma library was upgraded with our unique probe that is recombinant toxin protein fused with Fc-binding protein (DT3C), to generate immunotoxin library. Here we present; (A) principle of our targeting technology, and (B) discovery of anti-IL13Ra2 MoAb (clone NS66) that has potent activity as DT3C-based immunotoxin, (C) characterization of IL13Ra2 as novel melanoma biomarker as well as therapeutic target.

研究分野：腫瘍医科学

キーワード：IL13Ra2 イムノトキシン 悪性黒色腫 モノクローナル抗体

### 1. 研究開始当初の背景

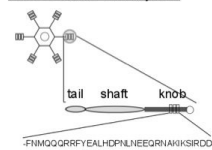
がんの三大療法に化学療法放射線療法外科的療法が挙げられるが、副作用の低減ならびにがんへの効率的な薬物送達などの治療法の開発が望まれていた。近年、これを可能とする標的化療法の開発がすすみ、抗体医薬品が臨床適応されるようになってきている。しかしながら、依然として限られた抗体医薬品が利用可能なのみであり、がんバイオマーカーだけでなく治療用抗体が望まれている。さらに、治療用抗体を探索する技術の開発についても強く望まれている。

### 2. 研究の目的

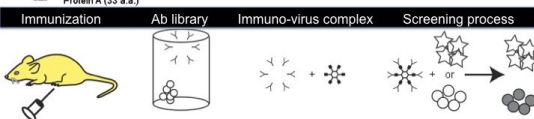
当研究室では、がん標的化治療に用いることの可能なシード抗体を探索する技術を開発しており、様々ながんに対して標的化抗体を作成している。この目的のために、アデノウイルスおよびジフテリア毒素を改変した抗体スクリーニングのためのプローブを独自に開発していた。多くのがん細胞を免疫したマウスの脾臓細胞から調製したハイブリドーマライブラリーを用いて、スクリーニングプローブを共役させた選抜を行ってきた。

Methods: hybridoma screening with Adv-FZ33 system

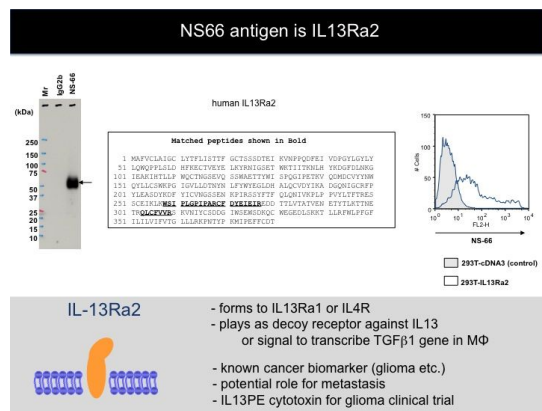
Adv-FZ33:CMV-LacZ system



- immunogen: various cancer cell including melanoma A375
- established > 600 clones
- identified about 60 independent antigens



中でも、特にメラノーマに対する標的化抗体として、独自の手法 (Adv-FZ33 改変型アデノウイルス) に基づき IL13Ra2 をメラノーマバイオマーカーとして見出していた。



そこで、本課題では主に IL13Ra2 を標的とした抗体治療の方法を開発する目的で、イムノトキシンならびに scFv トキシンの開発を行うことを目的とした。我々が独自に開発した改変型ジフテリア毒素 DT3C は、抗体結合ドメインを介して免疫複合体を作ることが可能である。この免疫複合体が、細胞表面に発現する IL13Ra2 と抗原抗体反応により複合体を形成し、なおかつ細胞内に内在化されると、ジフテリア毒素が細胞内へ移行して翻訳阻害を介して殺細胞効果を誘導する。この原理で、抗体の評価だけでなく治療実験を行うことを目的としている。また IL13Ra2 が分子標的として妥当かどうか検討を行うとともに、がん悪性化のメカニズムを明らかにすることも行った。

Hybridoma screening and therapeutic approach using DT

Diphtheria Toxin (DT)

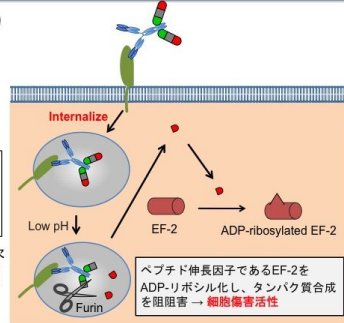


DT3C



Cat: Catalytic domain  
 T: Translocation domain  
 R: Receptor-binding domain  
 3C: Antibody-binding domain

DT3Cは受容体結合ドメインを欠失したジフテリアトキシンにFc結合蛋白質3Cを融合した組換え蛋白質である。抗原反応性と内在化活性を有する抗体を選別する探索プローブとなる。



### 3. 研究の方法

当研究グループの濱田らによって開発された DT3C イムノトキシンプローブを用いて、ハイブリドーマライブラリーを選抜する事を行った。さらに、DT3C と抗体を大量調製し、坦がんマウスモデルにおける抗体治療実験

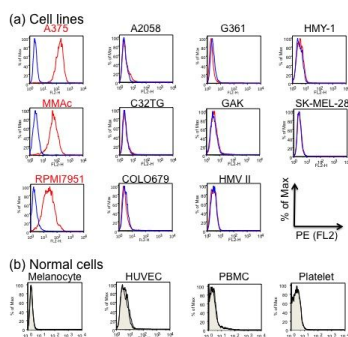
を行った。初年度の計画として、

- (1) Flow cytometry による IL13Ra2 のメラノーマ細胞株における発現
  - (2) KSN/S1c ノードマウスに移植したメラノーマ細胞株の造腫瘍性
  - (3) NS66 抗体の大量調製
- 二年目には、
- (4) DT3C 組み換えタンパク質の大量調製
  - (5) イムノトキシン NS66:DT3C による A375 に対する *in vitro* 殺癌効果
  - (6) A375 メラノーマ担癌マウスに対する NS66:DT3C イムノトキシンによる治療実験を計画した。

#### 4. 研究成果

(1) メラノーマ細胞株 11 種類について、IL13Ra2 の発現を検討した。全ての細胞が陽性ではなかったが、確かに一部のメラノーマ細胞では発現していることが確認された。正常細胞では発現が見られていないことから治療のための分子標的として相応しいと考えられた。また、flowcytometry による解析に加えて、このうちの幾つかの細胞については、IL13Ra1 ならびに IL4 (co-receptor として知られる) についてリアルタイム PCR によって発現量を検討した。その結果、A375 細胞では IL13Ra1 と IL13Ra2 の両者が発現していることを明らかにした。

NS66 antigen expressed in some melanoma cell lines



(2) メラノーマ A375 細胞株を含む 11 種類の細胞株について KSN/S1c を宿主とした担癌モデルの可能性を検討した結果、NS66 クローン

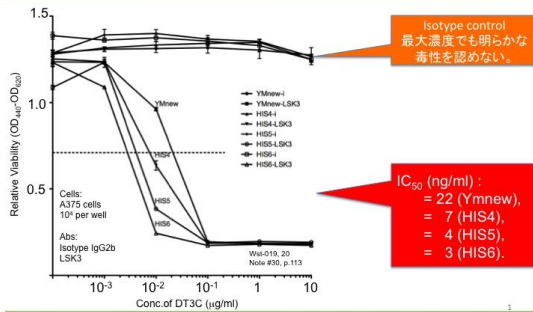
を得た抗原細胞でもある A375 細胞が相応しいと判断した。造腫瘍性を検討した期間は最長で 6 ヶ月であるが、造腫瘍性を示さないメラノーマ細胞株も存在した。

(3) NS66 クローンを無血清培地 (Cosmedium005) によって培養し、Protein G Sepharose を用いて anti-IL13Ra2 抗体を大量調製した。この抗体を 125 マイクログラム、KSN/S1c ノードマウスに投与したが、明らかな毒性は示さなかったため、今後治療実験に使う材料とする。上記の計画目標に到達したと考えた。

(4) (初年度) DT3C を M15(pREP4) 大腸菌を宿主として大量調製する方法は確立 (1L から 5mg-10mg) したが、His-tag によるアフィニティ精製ではエンドトキシン除去ができず、治療実験には十分量を適用できなかった。エンドトキシンの除去を複数 (イオン交換法、界面活性剤法、透析法等) ころみだが、EndTrap でも十分な収率と除去レベルに至らなかった。DT3C の等電点は低く、エンドトキシンのわりに低いエンドトキシンと区別して選別することが困難であったと考えている。Lucigen 社が販売する大腸菌 Clearcoli (LPS を脂質に変換する) を宿主として組み換えタンパク質を発現・精製することでエンドトキシンフリーとすることを目指しつつあり、現在までに発現誘導と NiNTA agarose による His-tag DT3C のアフィニティ精製に成功したので、大量精製のための条件最適化を行った。(二年目) 山口ら (Yamaguchi et al., 2015) が従来行っていた複数カラムを利用する精製法よりも簡便に、one-step にて大量調製する方法を確立した。約 5mg/L の収率により精製することが可能となった。

複数ロットの大量調製した DT3C は、*in vitro* におけるイムノトキシンアッセイによって、LSK3 抗体 (抗 CD71 抗体) を用いたところほぼ同等の殺細胞活性を示すことが明らかとなった。

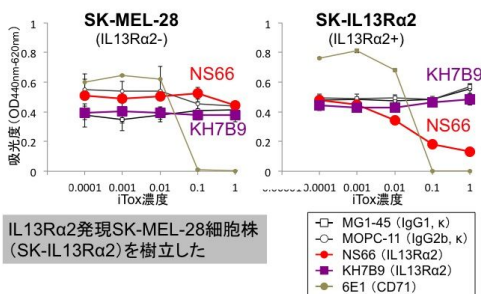
大量精製したDT3Cをもちいた *in vitro* トキシンアッセイ



大量調製した複数ロットのDT3Cは、ほぼ同等の活性を有していた。

(5) DT3C を利用した *in vitro* における A375 に対する殺癌効果は、信頼度高く再現されている。この実験における DT3C:NS66 複合体の IC<sub>50</sub> は、数十 nM 程度であった。また IL13Ra2 陰性の SKMEL28 細胞には殺細胞効果を示さなかった。

iToxの作用における抗原抗体反応依存性の検討



NS66を用いたiToxは抗原の発現依存的に細胞傷害を誘導する

(6) 予備の実験を含めて治療実験を行ったが、現在までのところ NS66:DT3C による有意な治療効果を認めなかった。また DT3C が大腸菌組み換え蛋白質として調製したことによるエンドトキシンの毒性によって十分な効果を認めることが困難であったと判断した。しかしながら、腫瘍内投与後の造腫瘍性は一時的に抑制されたとみられることから、エンドトキシン除去した DT3C を用いて増量したイムノトキシンによる治療効果が期待される。今後は、DT3C:NS66 をクロスリンクした架橋型イムノトキシンを用いること、サポリンを架橋した二次抗体を NS66 に対するセカンドイムノトキシンとして利用すること、また NS66 から設計した DT-scFv 融合蛋白質発現コンストラクトからの融合型 scFv

トキシンを調製することによって治療実験を再開する。

また二年目には、IL13Ra2 の造腫瘍性を司る必要十分性を詳細に検討する目的で、IL13Ra2 をノックダウンした A375 細胞株、IL13Ra2 陰性細胞に強制発現した機能昂進型細胞株を樹立し、移植したところ、IL13Ra2 依存的な造腫瘍性を呈することを示した。また樹立した KH7B9 抗体を用いて Tissue microarray を行ったところ IL13Ra2 陽性のメラノーマ患者が存在することを明らかにした。

以上のことから、治療ツールとしては(a) DT3C:NS66 クロスリンク複合体、(b) NS66 抗体遺伝子を増幅した DTscFv(NS66) 組換えトキシン、(c) サポリン結合型抗マウス二次抗体 Mouse-ZAP を購入して治療実験を進め、量ならびに投与間隔の最適化によって治療効果を最大にする条件の設定が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hayakawa T., Sakuma S., Fukuhara T., Yokoyama Y., and Arai F. A single cell extraction chip using vibration-induced whirling flow and a thermo responsive gel pattern. *Micromachines* **5(3)**, 681-696 (2014).

福原武志、渡部徹郎 TGF- シグナルからみた血管制御の均衡と破綻. 日本血栓止血学会誌 Vol. 25 No.5 p.609-614 (2014).

[学会発表](計 5 件)

Takeshi Fukuhara, Hirofumi Hamada, Hiroaki Uchida, and Tetsuro Watabe. IL13Ra2, therapeutic target of melanoma,

identified by unique antibody screening technology. Joint International Symposium on TGF- Family and Cancer ( Tsukuba, Japan ) 2015/1

Yuta Matsuura, Takeshi Fukuhara, Miho Ohsuga, Hiroaki Uchida, and Tetsuro Watabe. Development of anti-EpCAM ScFv toxin for cancer therapeutics. Joint International Symposium on TGF- Family and Cancer ( Tsukuba, Japan ) 2015/1

Mao Komai, Akiko Kunita, Teppei Morikawa, Hayato Okamoto, Moegi Sato, Hiroaki Uchida, Yasuhiro Yoshimatsu, Takeshi Fukuhara, Masashi Fukayama, Tetsuro Watabe Identification of Interleukin 13 Receptor alpha 2 (IL13R 2) as a novel marker of human melanoma. Joint International Symposium on TGF- Family and Cancer ( Tsukuba, Japan ) 2015/1

Hayato Okamoto, Moegi Sato, Hiroaki Uchida, Yasuhiro Yoshimatsu, Takeshi Fukuhara, Tetsuro Watabe Interleukin 13 receptor alpha 2 expression increases the growth of human melanoma xenograft in mice. Joint International Symposium on TGF- Family and Cancer ( Tsukuba, Japan ) 2015/1

福原武志、佐藤萌希、岡本勇人、内田宏昭、濱田洋文、渡部徹郎、メラノーマ新規バイオマーカーとして同定した IL13R $\alpha$ 2 の機能解析. 第 87 回 日本生化学会、2014/10、京都

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://is-toyaku-oncology.net>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福原 武志 (Fukuhara, Takeshi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号 : 2 0 3 5 9 6 7 3

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :